

総 説 (2019年度横浜市立大学医学研究奨励賞受賞論文)

難治性骨関節感染症に対する新規診断法と治療法の探求

崔 賢 民

横浜市立大学医学部 整形外科

要 旨：骨関節感染症は診断と治療に難渋することが多い。骨関節感染症では、局所におけるバイオフィルムの形成により細菌培養検査が偽陰性となることも多く、様々な検査を組み合わせる必要がある。リアルタイムPCRなどによる遺伝子検査は、細菌培養偽陰性症例でも原因菌や耐性菌の同定が可能となることも多く、PET検査などの核医学画像診断は、感染診断のみでなく感染巣の同定にも有用であり、感染診断の向上に寄与することが期待される。広範なバイオフィルムの形成が、骨関節感染症での難治化に関わっており、治療ではインプラントの抜去や適切な感染巣の洗浄、壊死組織のデブリドマンに加えて、局所の高濃度抗菌治療が重要である。抗微生物ペプチドなどの新規の感染治療薬は、現在開発段階ではあるが、今後の骨関節感染症の新しい治療薬として期待される。

Key words: 人工関節周囲感染 (Periprosthetic Joint Infection), バイオフィルム (Biofilm), 遺伝子診断 (Genetic diagnosis), 局所抗菌治療 (Local antibiotic therapy), 抗微生物ペプチド (antimicrobial peptide)

はじめに

整形外科手術では、骨折部や骨欠損部の安定化を目的として、インプラントを用いることが多い。近年の手術技術やインプラントにおけるテクノロジーの進歩に伴い、整形外科手術の術後長期成績は飛躍的に向上しているが、一方で、整形外科手術における一般的な合併症である骨関節感染症は、依然として難治性となることが多い重篤な合併症である¹⁻⁴⁾。インプラントを用いた整形外科手術の代表として、人工関節手術と脊椎インストゥルメンテーション手術があるが、いずれの手術においても、最も診断と治療に難渋する合併症が術後感染であり、これらは難治性の骨関節感染症として認識されている。感染が発症し治療が奏功しない場合、患者の日常生活は大きく損なわれるため、早期の診断と適切な治療が重要であるが、一方で、その診断、治療の技術はまだ発展途上にあり、今後の改善が必要とされている。また、近年の高齢化に伴い、人工関節手術や脊椎インストゥルメンテーション手術の需要の増加とともに、難治化した人工関節周囲感染や脊椎インストゥルメンテーション感染に苦し

む患者数も増加傾向にある。

人工関節や脊椎インストゥルメンテーションの術後感染が難治性となる理由として、菌がインプラント周囲にバイオフィルムを形成することが挙げられる。インプラントに付着した細菌はいくつかのステップを踏みながらも短時間でバイオフィルムを形成し^{5, 6)}、多くの菌はどんな材質にも付着しバイオフィルムを形成し、人体組織にもバイオフィルムは形成されることが報告されている(図1)⁵⁾。特に、血流の停滞した骨髄や壊死した軟部組織の感染では、局所におけるバイオフィルムの形成が難治化の要因となる。さらに、バイオフィルム内の菌は、分離培養された菌とは大きく異なる動態を示すため、バイオフィルムが形成された骨関節感染症では、細菌培養検査が偽陰性となることが多く^{2, 7)}、難治性骨関節感染症の診断に、新規の特異的な診断方法が求められている²⁾。また、インプラント周囲に形成されたバイオフィルムは生体の免疫細胞や投与された抗菌薬から菌を保護する作用を持つ。バイオフィルムに対して有効な抗菌薬は少なく、従来の感染治療ではバイオフィルム内の菌を治療することは困難であることや、バイオフィルム内で

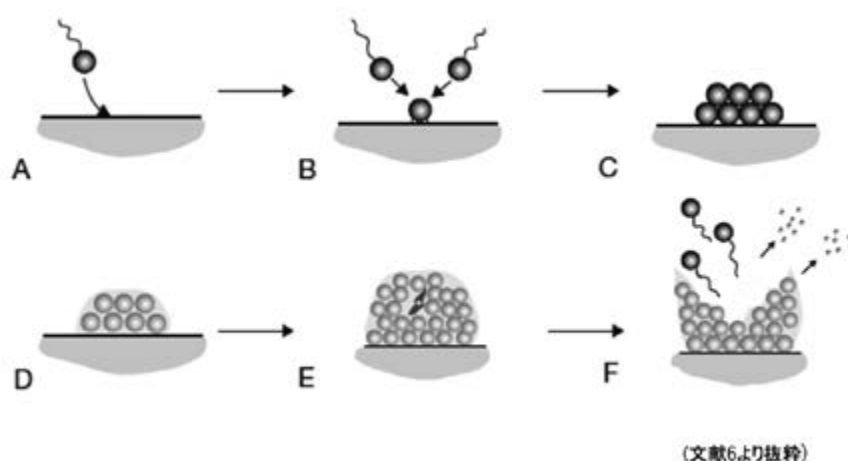


図1：Biofilm形成のサイクル

細菌が組織または生体材料に付着した後に (A)、細菌同士が付着・集簇しながら (B)、急速に増殖する (C) ことで細胞外多糖体の産生が行われバイオフィームが形成される (D)。バイオフィームの成熟と共に菌は抗菌薬への耐性や免疫細胞への耐性を獲得し (E)、十分に成熟したバイオフィームからは新たに菌が放出され (F)、新しい感染巣が形成される (A) ⁶⁾。

は菌の相互作用による抗菌薬への耐性化を獲得することから、骨関節感染症の治療には、バイオフィームの破壊を可能とする高濃度の抗菌薬を局所に選択的に投与方法や、抗菌薬に替わる新しい治療方法を用いながら骨関節機能を再建する技術が求められている^{8, 9)}。

本稿では、難治性骨関節感染症に対してわれわれが行ってきた新規の診断および治療として、機能的画像診断や遺伝子診断、局所抗菌治療、抗微生物ペプチドの有用性と今後の課題について紹介する。

I. 難治性骨関節感染症の診断

整形外科領域の感染性疾患では、細菌培養検査が偽陰性となる症例が多い。その原因として、細菌が腐骨やインプラントに付着するとバイオフィームを形成し、バイオフィーム内の菌が、細菌が培地で発育しない[viable but non-culturable (VBNC)]の状態で存在することが挙げられる^{5, 10)}。そのため、整形外科領域では感染が成立しているにも関わらず細菌培養検査が偽陰性となり、非感染性と診断されることも少なくない⁷⁾。さらに整形外科領域の感染症は、不適切な診断が治療を難渋させていることが多く、感染の診断は様々な検査から多角的に行う必要がある。

人工関節周囲感染は、骨関節感染症の中でも最も診断に難渋する疾患の一つであり、アメリカ整形外科学会 (American Academy of Orthopaedic Surgeons: AAOS) では、2010年に人工関節周囲感染のアルゴリズムを用いた診断を推奨している。血液中のCRPおよびESRの測定は、代表的な血清学的スクリーニング検査として最も簡易で精度に優れたスクリーニング方法であるが偽陽性も多い。

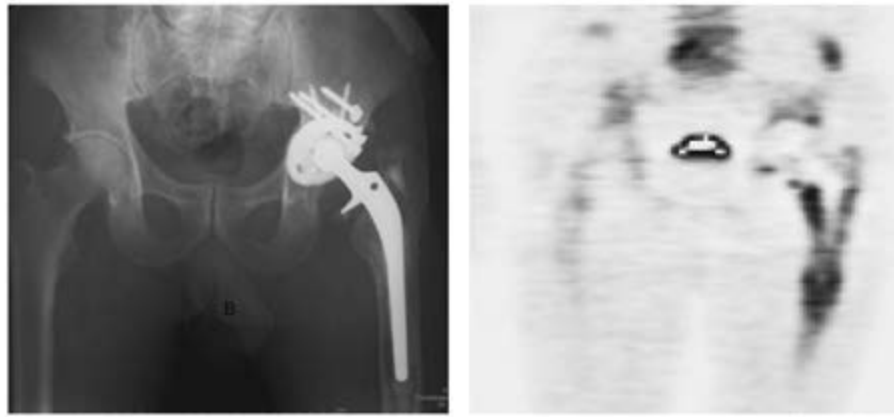
このような従来の検査方法は、診断の精度に限界があり、様々な新しい検査や診断法に関する報告が行われている。近年では分子生物学的な感染診断法の発展が目覚ましく、特に遺伝子検査による細菌性DNAの同定やプロテインアッセイによる抗微生物ペプチドや炎症性サイトカインの同定を感染診断に臨床応用していくことで、整形外科領域の感染症をより高い精度で診断することが可能となっている^{2, 3, 11)}。

II. 骨関節感染症の画像診断

人工関節周囲感染のようなインプラント感染では、金属ハレーションによりCTやMRIによる患部の画像評価が困難となる。そこでわれわれは機能的画像診断として、骨代謝を反映する^{18F}-fluoride PETおよび局所の炎症を反映するFDG-PETを人工関節周囲感染症例の診断に用いてその有用性について検証した (図2)^{12, 13)}。人工関節周囲感染では、無菌性と比較して、広範囲で局所の骨代謝や糖代謝の亢進が生じていることが多い^{12, 13)}。このような広範囲な局所の骨代謝や炎症所見を分類化することで、高い感度・特異度で感染の診断が可能であり¹²⁾、またPETの取り込みが強い部分では、細菌培養検査や病理組織検査が陽性となることが多いことから¹²⁾、PETの所見は感染部位の特定に有用であると考えられる。

III. 骨関節感染症の遺伝子診断

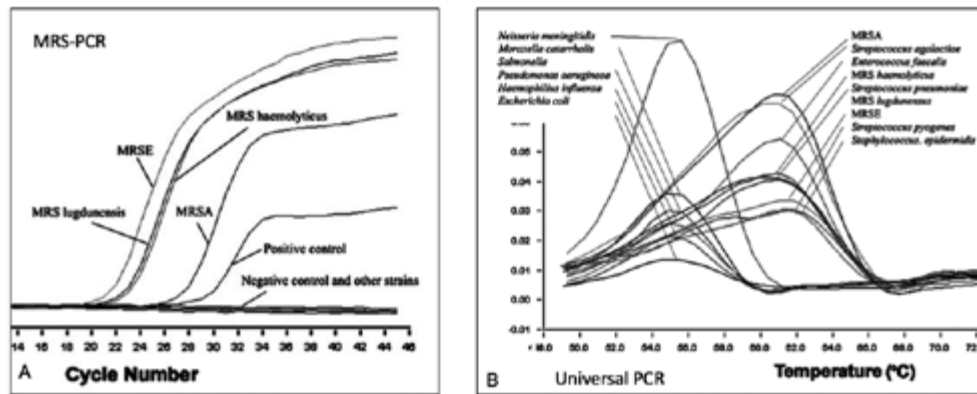
近年では、本邦においても遺伝子診断機器が呼吸器感染症や敗血症症例において保険収載され臨床応用されており、人工関節周囲感染の診断においてもその有用性が



(文献12より抜粋)

図2：人工股関節周囲感染における画像診断

左人工股関節周囲感染患者における股関節 X 線像でインプラント周囲にゆりみを認め (A)、18F Fluoride PET にてインプラント周囲に集積を認める (B)。集積部位から採取した組織で、細菌が同定されており、18F Fluoride PET 集積部位は感染巣を反映していることが示唆される¹²⁾。



(文献15より抜粋)

図3：骨関節感染症診断における MRS-PCR および Universal PCR

- A：臨床分離株に対して、メチシリン耐性ブドウ球菌 (MRS) に特異的な *mecA* 遺伝子をターゲットとした MRS-PCR を用いて、高い感度で MRS 診断が可能であることを検証した (in-vitro)¹⁵⁾。
- B：臨床分離株に対して、全細菌が有する 16sRNA 遺伝子をターゲットとした Universal PCR を用いることで、細菌感染の診断と、融解曲線分析を用いたグラム陽性菌とグラム陰性菌の判別が可能であることを検証した (in-vitro)¹⁵⁾。

期待される^{2, 3)}。PCR法に代表される分子生物学的な遺伝子診断技術は、細菌性DNAをターゲットとすることで、菌を培養せずに原因菌の菌種の判別や耐性菌の同定を迅速に (1-3 時間以内) 行えることが大きな利点である。これまでにわれわれは、人工関節周囲感染や小児化膿性股関節炎、化膿性脊椎炎の診断として、メチシリン耐性菌特異的PCRおよび全細菌をターゲットとした universal PCR の診断精度について評価し、従来の診断方法と比較して、高い感度で細菌性DNAの同定が可能であることを検証した。またリアルタイムPCRを組み合わせることで、MRSの診断やグラム陽性・陰性菌の診断が可能であることも報告している (図3)¹⁴⁻¹⁸⁾。整形外科感染症の診断においても、マルチプレックスPCRによる多種類の細菌性・薬剤耐性遺伝子の同定、next-generation

sequencing を用いた細菌の菌種同定、細菌性DNAをターゲットとした簡易迅速診断法などにより、微量の細菌性DNAから細菌感染の診断が可能であることや、薬剤耐性遺伝子をターゲットとすることで耐性菌の診断が可能であること、細菌性DNAの増幅と同定の過程をより迅速化することで術中の細菌感染診断が可能となること、細菌性DNAのシーケンシング (塩基配列の決定) を行うことで原因菌の菌種の同定が可能であることなどが有用性として報告されている^{1, 14, 15, 19)}。

一方で、これら遺伝子検査の欠点として、高すぎる感度がコンタミネーションによる偽陽性率をあげてしまう、DNAの抽出などの検査手技が煩雑である、費用が高く保険適応でないためコストを取れないなどの問題から、汎用性に乏しい検査であることが大きな課題である²⁾。近

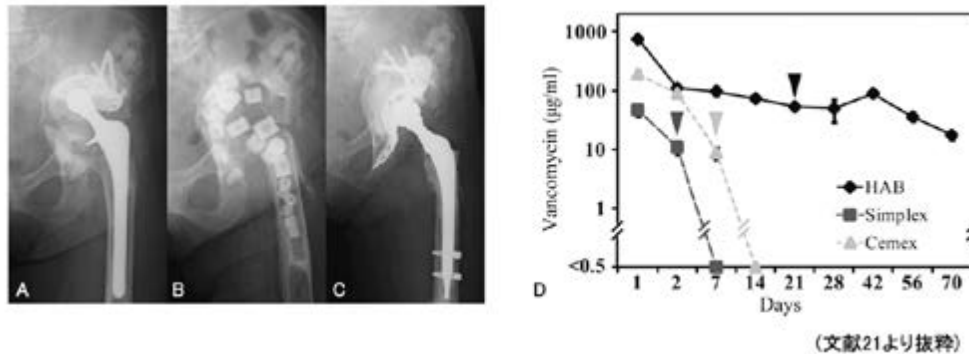


図4：人工股関節周囲感染に対してハイドロキシアパタイトブロックスパーサーを用いた2期の人工股関節再置換術

人工股関節周囲感染患者（A）では、ゆるみを認めたインプラントを抜去し、抗菌薬を含有したスパーサー（ここではハイドロキシアパタイトブロックを使用）を局所に留置することで、高濃度の抗菌薬の放出を局所に行い、感染巣の殺菌を行う（B）。一定の待機期間の後に同種骨などを用いて人工股関節再置換術を行う（C）。スパーサーには骨セメント（Simplex, Cemex など）が一般的に用いられるが、ハイドロキシアパタイトブロック（HAB）は骨セメントと比較して抗菌薬の徐放量と期間に優れる（D）²¹⁾。

年、解決策として、全自動遺伝子解析装置が、感染症診断に応用されており、呼吸器や腸管感染、敗血症や結核菌感染症などでは、すでに体外診断用医薬品として保険収載されている（GENE CUBE[®]；東洋紡, Verigene[®]；Nanosphere 社, GenXpert；Cepheid 社, Film Array；BioMerieux 社など）。全自動遺伝子解析装置はDNAの抽出や増幅、対象遺伝子領域の同定までの過程を検査機器内で完了することが可能であり、コンタミネーションのリスクを最小化し、ハンズオンタイムの減少するとともに、検査の過程を迅速化することが可能である。骨関節感染症の感染診断には、これらの遺伝子診断はまだ保険適応となっていないが、今後は全自動化された遺伝子診断装置を用いることで、人工関節周囲感染を含めた整形外科感染症診断の精度と信頼性の向上に貢献することが可能であると考えており、診断方法の最適化を模索するとともに、その有用性について検証中である。

IV. 難治性骨関節感染症の治療

細菌性感染の治療は、全身性に投与した抗菌薬による殺菌が一般的である。一方で、骨関節感染症では、局所の血流の低下やバイオフィルムの形成に伴い、通常の抗菌治療のみでは局所の感染の鎮静化が得られないことが多い^{5, 8, 9)}。特に、バイオフィルム内の菌は浮遊細菌と異なるため、抗菌薬によるバイオフィルムの治療には、バイオフィルムを破壊しバイオフィルム内の菌を死滅するのに十分な量の抗菌薬濃度（Minimum biofilm eradication concentration: MBEC）を、局所に到達させる必要がある⁵⁾。MICを基準とした抗菌薬の使用はバイオフィルムの治療としては限界があるため、MBECの臨床応用が期待されるが、臨床的有用性については今後の検証が必要

とされている。MBECを満たすように抗菌薬を使用する場合は、全身性の抗菌薬投与では困難であり、MIC値の100から1000倍以上の高濃度の抗菌薬を長期間局所に投与させるための工夫が必要である⁸⁾。そのため、骨関節感染症治療では、確実な殺菌と感染の沈静化のために、バイオフィルムが形成されているインプラントの抜去や組織のデブリドマンと死腔を埋めながら局所の抗菌治療を可能とするスパーサーを用いた治療方法が一般的である（図4）²⁰⁾。局所のスパーサーを用いた治療方法として、抗菌薬充填セメントが従来用いられているが、セメントから発生する重合熱は抗菌薬の活性を低下させ、徐放性に乏しいことなどが欠点として挙げられる⁸⁾。われわれは、人工股関節周囲感染の治療に、抗菌薬を含有したハイドロキシアパタイトブロックを用いている（図4）²¹⁾。ハイドロキシアパタイトブロックは生体との親和性が高く異物反応を起こさないこと、セメントと比較して、高い濃度の抗菌薬を長期間局所に放出することが可能であるため²¹⁾、本方法を用いて治療を行った骨関節感染症患者27例では、従来と比較して優れた感染鎮静化率を獲得することが可能であった。一方で、欠点として、スパーサーの留置期間（約3ヵ月）中は荷重が困難なため、患者さんのADLの低下が懸念されており、周術期のADLの改善を考慮した治療方法の改良が必要であると考ええる。

V. 抗微生物ペプチドを用いた骨関節感染治療の探索

抗菌薬の使用は菌の耐性化を促進し、長期間の抗菌薬の使用は様々な合併症を起こすことから、抗菌薬に変わる新規の感染治療薬が期待されている。抗微生物ペプチドは、動植物に発現し、殺菌作用だけでなく免疫賦活作

用を持つことで、新規の感染治療薬としての臨床応用が期待されている。特に人工抗微生物ペプチドは、比較的安価に精製が可能であり、殺菌作用や免疫賦活作用の修飾が可能である。そこでわれわれは、人工抗微生物ペプチドの一つである IDR-1018 に注目して、インプラント感染に対する抗菌作用、抗炎症作用、骨破壊抑制作用を、マウス骨髄由来マクロファージ (*in vitro*) およびインプラント感染マウスモデル (*in vivo*) を用いて検証した²²⁾。その結果、IDR-1018 は黄色ブドウ球菌に対して強い抗菌作用を持ち、その抗菌作用は溶媒がもつ電解質濃度などに左右されないこと、また細菌刺激によりマクロファージが産生する炎症性サイトカインの産生抑制作用を持つこと、さらにインプラント感染マウスモデルを用いた検証で、インプラント感染に対する感染沈静化作用およびインプラント周囲の骨融解を抑制する作用を持つことを検証した。人工抗微生物ペプチドは、まだ難治性骨関節感染症の治療に関する報告が少なく、今後、動物における検証を重ねるとともに臨床的に最適な投与量や投与方法についての探索を行っていく予定である。

おわりに

骨関節感染症では、感染の診断が困難であることが、難治化する要因の一つとなっている。骨関節感染症の適切な診断には、様々な検査を組み合わせる必要がある。遺伝子診断や核医学を用いた機能的画像診断により、より高い精度の診断を行える可能性が示唆された。骨関節感染症では広範なバイオフィームが病態に関わっており、治療ではインプラントの抜去や適切な感染巣の洗浄、壊死組織のデブリドマンに加えて、局所の高濃度抗菌治療が術後成績の向上に重要である。また抗微生物ペプチドなどの新規の感染治療薬は、現在開発段階ではあるが、今後の骨関節感染症の新しい治療薬として、有用である可能性が示唆された。

謝 辞

本研究に際して多大なご指導、ご協力を頂いた横浜市立大学整形外科の稲葉裕教授と股関節グループの先生方、横浜市立大学附属市民総合医療センター整形外科の小林直実先生に心より感謝申し上げます。

文 献

- 1) Abdel M.P., et al.: Hip and Knee Section, Diagnosis, Pathogen Isolation, Culture: Proceedings of International Consensus on Orthopedic Infections. J Arthroplasty, **34** (2 S) : S361 – S367, 2019.
- 2) Choe H., et al.: Molecular diagnostics. J Am Acad Orthop Surg, **23** Suppl: S26 – 31, 2015.
- 3) Proceedings of the Second International Consensus Meeting on Musculoskeletal Infection. 2018.
- 4) 日本整形外科学会, 日. 関. 監. 日., 骨・関節術後感染予防ガイドライン策定委員会 編集 骨・関節術後感染予防ガイドライン2015改訂第2版. 2015.
- 5) Saeed K., et al.: 2018 international consensus meeting on musculoskeletal infection: Summary from the biofilm workgroup and consensus on biofilm related musculoskeletal infections. J Orthop Res, **37** (5) : 1007 – 1017, 2019.
- 6) 崔 賢民, 小 直, 稲葉 裕: バイオフィームに関するコンセンサス. 国際コンセンサスからみた整形外科感染対策における最新知見. 整形・災害外科, **63**: 267 – 272, 2020.
- 7) Watanabe S., et al.: Differences in Diagnostic Properties Between Standard and Enrichment Culture Techniques Used in Periprosthetic Joint Infections. J Arthroplasty, **35** (1) : 235 – 240, 2020.
- 8) Schwarz E.M., et al.: Adjuvant antibiotic-loaded bone cement: Concerns with current use and research to make it work. J Orthop Res, 2020.
- 9) Saeed K., et al.: Bacterial toxins in musculoskeletal infections. J Orthop Res, 2020.
- 10) Trevors J.T.: Viable but non-culturable (VBNC) bacteria: Gene expression in planktonic and biofilm cells. J Microbiol Methods, **86** (2) : 266 – 273, 2011.
- 11) ICM 翻訳プロジェクトチーム: 整形外科感染対策における国際コンセンサス 人工関節周囲感染を含む筋骨格系感染全般. 2019.
- 12) Choe H., et al.: Use of 18F-fluoride PET to determine the appropriate tissue sampling region for improved sensitivity of tissue examinations in cases of suspected periprosthetic infection after total hip arthroplasty. Acta Orthop, **82** (4) : 427 – 432, 2011.
- 13) Choe H., et al.: (18) F-fluorodeoxy glucose and (18) F fluoride PET for detection of inflammation focus in periprosthetic hip joint infection cases. Mod Rheumatol, **25** (2) : 322 – 324, 2015.
- 14) Choe H., et al.: Rapid sensitive molecular diagnosis of pyogenic spinal infections using methicillin-resistant Staphylococcus-specific polymerase chain reaction and 16S ribosomal RNA gene-based universal polymerase chain reaction. Spine J, **14** (2) : 255 – 262, 2014.
- 15) Choe H., et al.: Use of real-time polymerase chain reaction for the diagnosis of infection and differentiation between

- gram-positive and gram-negative septic arthritis in children. *J Pediatr Orthop*, **33** (3) : e28 – 33, 2013.
- 16) Choe H., et al.: Evaluation of the time period for which real-time polymerase chain reaction detects dead bacteria. *Pol J Microbiol*, **63** (4) : 393 – 398, 2014.
 - 17) Kobayashi N., et al.: Simultaneous intraoperative detection of methicillin-resistant *Staphylococcus* and pan-bacterial infection during revision surgery: use of simple DNA release by ultrasonication and real-time polymerase chain reaction. *J Bone Joint Surg Am*, **91** (12) : 2896 – 2902, 2009.
 - 18) Kobayashi N., et al.: Rapid and sensitive detection of methicillin-resistant *Staphylococcus* periprosthetic infections using real-time polymerase chain reaction. *Diagn Microbiol Infect Dis*, **64** (2) : 172 – 176, 2009.
 - 19) Tarabichi M., et al.: Diagnosis of Periprosthetic Joint Infection: The Potential of Next-Generation Sequencing. *J Bone Joint Surg Am*, **100** (2) : 147 – 154, 2018.
 - 20) Argenson J.N., et al.: Hip and Knee Section, Treatment, Debridement and Retention of Implant: Proceedings of International Consensus on Orthopedic Infections. *J Arthroplasty*, **34** (2 S) : S399 – S419, 2019.
 - 21) Choe H., et al.: Clinical utility of antibiotic-loaded hydroxyapatite block for treatment of intractable periprosthetic joint infection and septic arthritis of the hip. *Mod Rheumatol*, **25** (6) : 937 – 942, 2015.
 - 22) Choe H., et al.: Immunomodulatory Peptide IDR-1018 Decreases Implant Infection and Preserves Osseointegration. *Clin Orthop Relat Res*, **473** (9) : 2898 – 2907, 2015.

Abstract

CHALLENGES FOR IMPROVING THE DIAGNOSIS AND TREATMENT OF MUSCULOSKELETAL INFECTIONS

Hyonmin CHOE

Department of Orthopaedic Surgery, Yokohama City University

Musculoskeletal infections are among the most intractable disorders in the orthopedic field. Microbiological cultures are often falsely negative due to local biofilm formation that confounds accurate diagnosis and treatment. Genetic tests such as real-time PCR facilitate identification of causative bacteria and antibiotic resistance in false-negative culture cases. Nuclear medicine imaging, such as positron emission tomography, is a diagnostic tool that can be used to detect the focus of infection, as well as diagnose infection. These novel diagnostic tests are expected to contribute to improving the diagnosis of infection. For the treatment of musculoskeletal infections, debridement of necrotic tissue and removal of implants are often necessary to eradicate bacteria and biofilms. Extensive biofilm formation also requires further treatment by highly concentrated local antibiotics. Antibiotic-impregnated spacers can provide efficient delivery of antibiotics to the local lesion, but further improvement is needed to achieve a better infection eradication rate and better functional outcomes. Antimicrobial peptides are a good candidate as novel therapeutic agents for musculoskeletal infections.